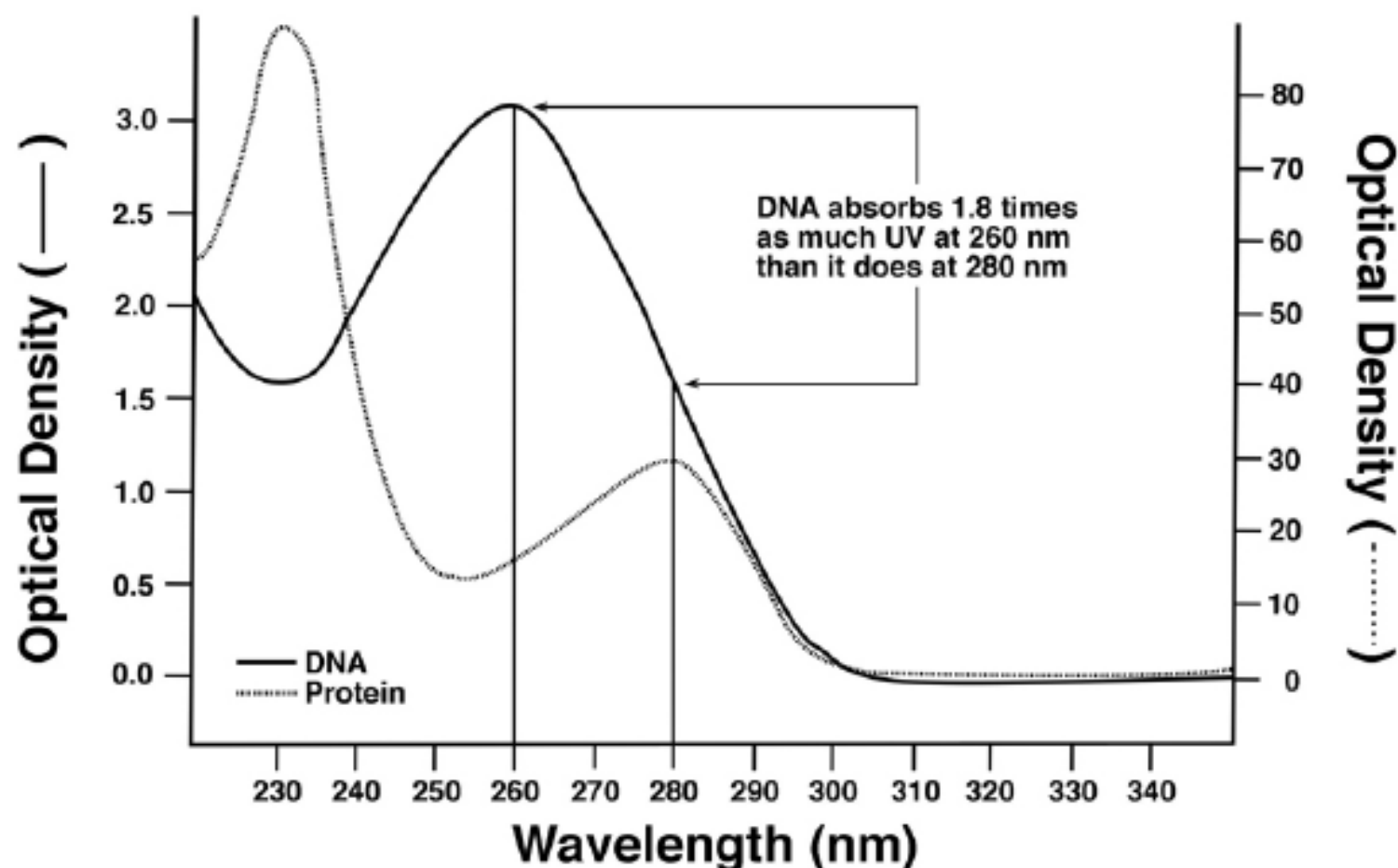


- Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA je založeno na poznatku, že roztoky DNA pohlcují UV záření.
- Záření je pohlcováno pyrimidinovými a purinovými bázemi DNA. Dochází k excitaci jejich chemických vazeb, což má za následek postupnou degradaci DNA. Absorpční maxima jednotlivých nukleotidů se navzájem poněkud liší: dATP ... 259 nm, dCTP ... 271 nm, dGTP ... 253 nm, dTTP ... 267 nm. DNA absorbuje maximálně UV záření o vlnové délce 260 nm.
- Množství pohlceného UV záření je přímo úměrné koncentraci DNA v roztoku a vyjadřuje se hodnotami absorbance
- Bez problémů pro roztoky čisté DNA
- Při izolaci DNA – kontaminace proteiny, aromatické aminokyseliny také absorbují v UV oblasti
- Kontaminaci RNA nejsme schopni obvykle pomocí UV spektrofotometrie odlišit (agarózová elektroforéza)

- Výhodou spektrofotometrického stanovení je jeho přesnost a současná možnost posoudit čistotu preparátu. Čistotu DNA lze stanovit z poměrů absorbancí při různých vlnových délkách. Pro čistou DNA platí tyto hodnoty:
 - $A_{280}/A_{260} = 0,550$ $A_{260}/A_{280} = 1,8$ až $1,9$
 - $A_{230}/A_{260} = 0,455$ $A_{260}/A_{230} = 2,20$
- Stupeň znečištění DNA lze posoudit rovněž proměřením absorbance vzorku v rozsahu vlnových délek 230 - 300 nm a vyhodnocením získané křivky.



STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY DNA

SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA

Je to vhodná metoda pro měření vzorků nukleových kyselin, které jsou dostatečně čisté bez významného množství kontaminantů.

Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm.

Z hodnot optické hustoty lze koncentraci a čistotu vzorku stanovit podle empirických vztahů.

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

množství vcházejícího světla

množství světla propuštěného

Nejpřesnější je stanovení absorbance v rozmezí od **0,1** do **1,0**.

SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA - 2

Při stanovení koncentrace DNA platí :

ds DNA $A_{260} = 1$ odpovídá 50 $\mu\text{g/ml}$

ss DNA $A_{260} = 1$ odpovídá 33 $\mu\text{g/ml}$

Oligonukleotidy $A_{260} = 1$ odpovídá 20 $\mu\text{g/ml}$

ss RNA $A_{260} = 1$ odpovídá 40 $\mu\text{g/ml}$

Tyto vztahy platí pro optickou dráhu 1 cm (šířka kyvety)



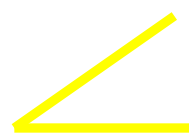


Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorpance při 260 a 280 nm.

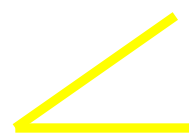
Pro **DNA** platí: $A_{260}/A_{280} = 1,80$ až $1,90$

Pro **RNA** platí: $A_{260}/A_{280} = 1,90$ až $2,1$

proteiny a
aromatické
látky (fenol)



1,85



2 a více =
masivní
kontaminace
RNA

PŘEČIŠTĚNÍ VZORKU DNA

- **odstranění fenolu:**

dialýza, extrakce chloroformem

- **odstranění proteinů:**

opakovaná deproteinace chloroformem. Lze použít rovněž enzymové degradace proteinů pomocí pronázy nebo proteinázy. Přechištění na chromatografických kolonkách.

- **odstranění RNA:**

enzymová degradace pomocí RNázy

Alternativní metody

- Využití flouroforů, které se váží na DNA a intenzita jejich fluorescence je úměrná koncentraci DNA – vysoká citlivost
- Využití v např. v lyzátech buněk (silné znečištění proteiny – vazba na DNA musí být specifická)
- př. Hoechst 33342, ethidium bromid, PicoGreen, ...
- Měříme proti nějakému standardu o známé koncentraci

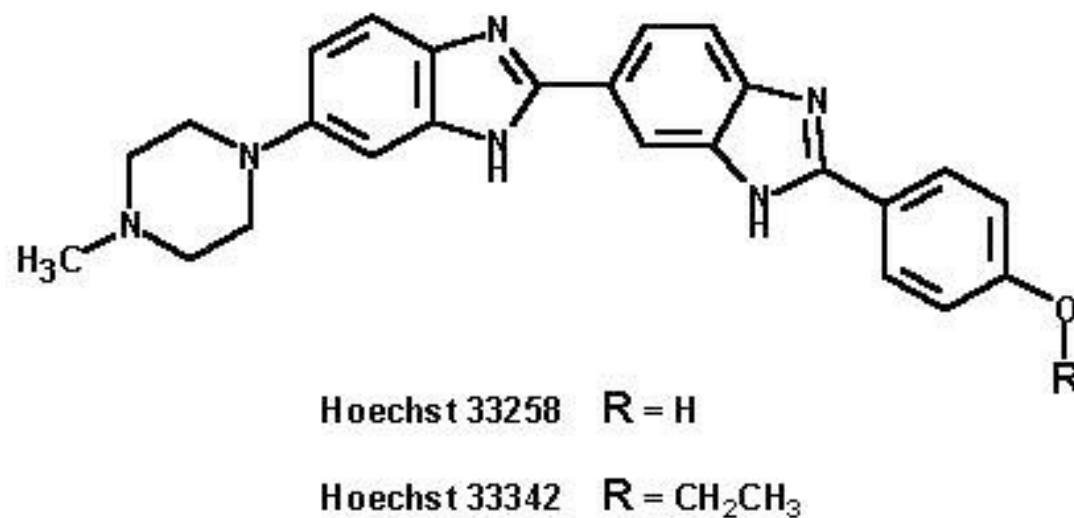


Figure 1. Chemical structure of Hoechst 33258 and Hoechst 33342 used in this study

- Necitlivé na znečištění ale zároveň nás na znečištění neupozorní

Postup měření koncentrace DNA

Plazmidovou DNA nejprve důkladně promíchejte, a naředte $5 \times$ v TE pufru - výsledný objem $10 \mu\text{l}$

Změřte jeho koncentraci na Nanodropu (objem $2 \mu\text{l}$)

Určete koncentraci a čistotu DNA v původním neředěném vzorku

Enzymy, jejichž substrátem jsou NK

A. Podle typu substrátu

- DNA enzymy
- RNA enzymy

B. Podle typu reakce

- enzymy syntetizující NK (anaboličké) = polymerázy
- enzymy odbourávající NK (kataboličké) = nukleázy
- enzymy modifikující NK
- enzymy spojující molekuly NK = ligázy

DNA Nukleázy

| rozkládaná molekula | typ degradace | název enzymové třídy | specifita | Příklad | zdrojový organismus |
|---------------------|-----------------|----------------------|-----------|-------------------------|------------------------------|
| DNA | od konců | Exonukleázy | ss | Exonukleáza III | <i>E. coli</i> |
| | | | ds | Bal 31 | <i>Alteromonas espejiani</i> |
| | uvnitř molekuly | Endonukleázy | ss | S1 nukleáza | <i>Aspergillus oryzae</i> |
| | | | ds | restrikční endonukleázy | bakterie |
| | | | | DNáza I | Hovězí pankreas |

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Restrikční endonukleázy (restriktázy – zkr. **RE**)

sekvenčně specifické endonukleázy štěpící fosfodiesterovou vazbu DNA v určité sekvenci nukleotidů (často palindromy).

Původ: produkty bakterií

EcoRI (*Escherichia coli*) – 37° C (kmen/serotyp)

SmaI (*Serratia marcescens*) – 25 °C

MaeIII (*Methanococcus aeolicus*) – 55 °C

Funkce: odbourávání cizorodé DNA (např. fágy).

- vlastní DNA chráněna metylací

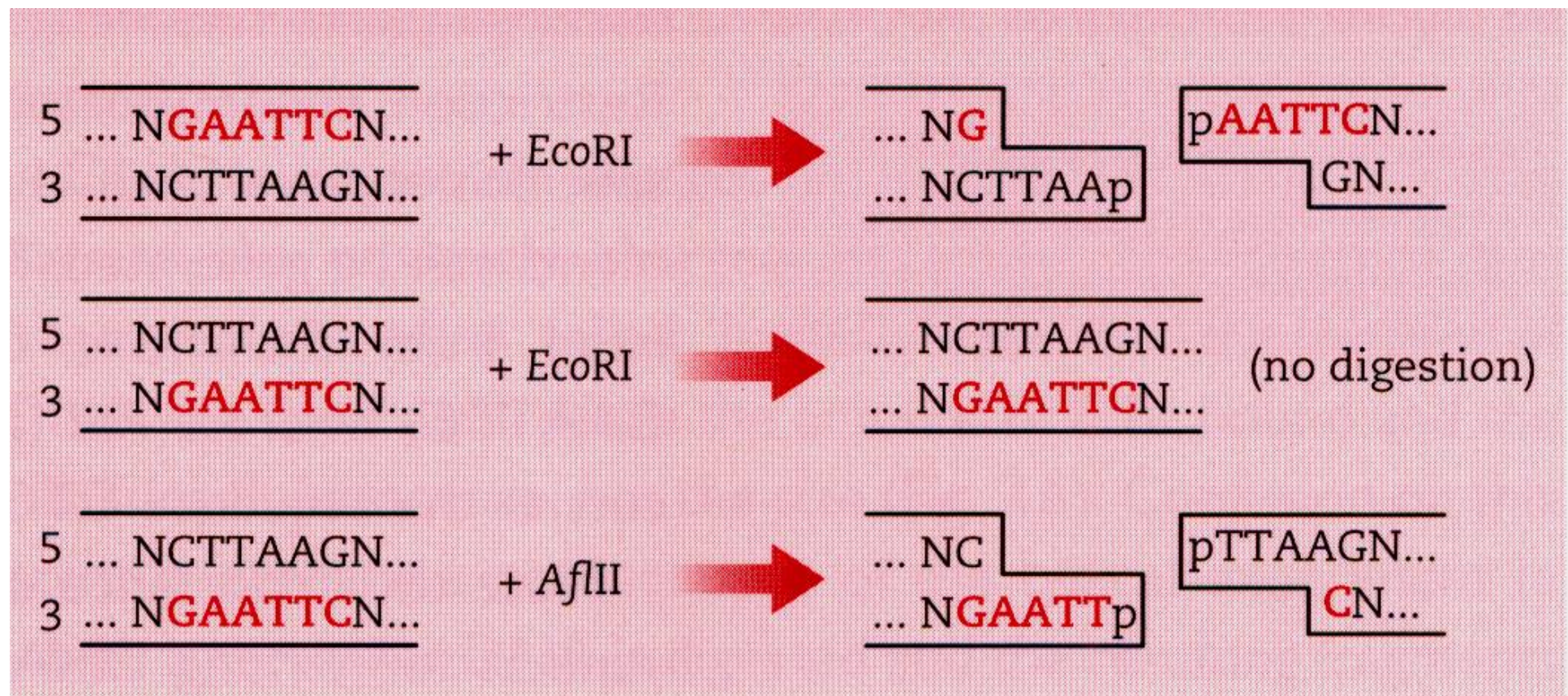
Typy RE: I, **II**,

Typ II: na dsDNA má stejné rozpoznávací místo (4 – 8 bp) s místem štěpení.

EcoRI



Orientace je důležitá



EcoRI má relaxovanou specifitu - za neoptimálních podmínek může štěpit DNA v příbuzných sekvencích

(HF – high fidelity mutanti)

5` GAATTC 3`

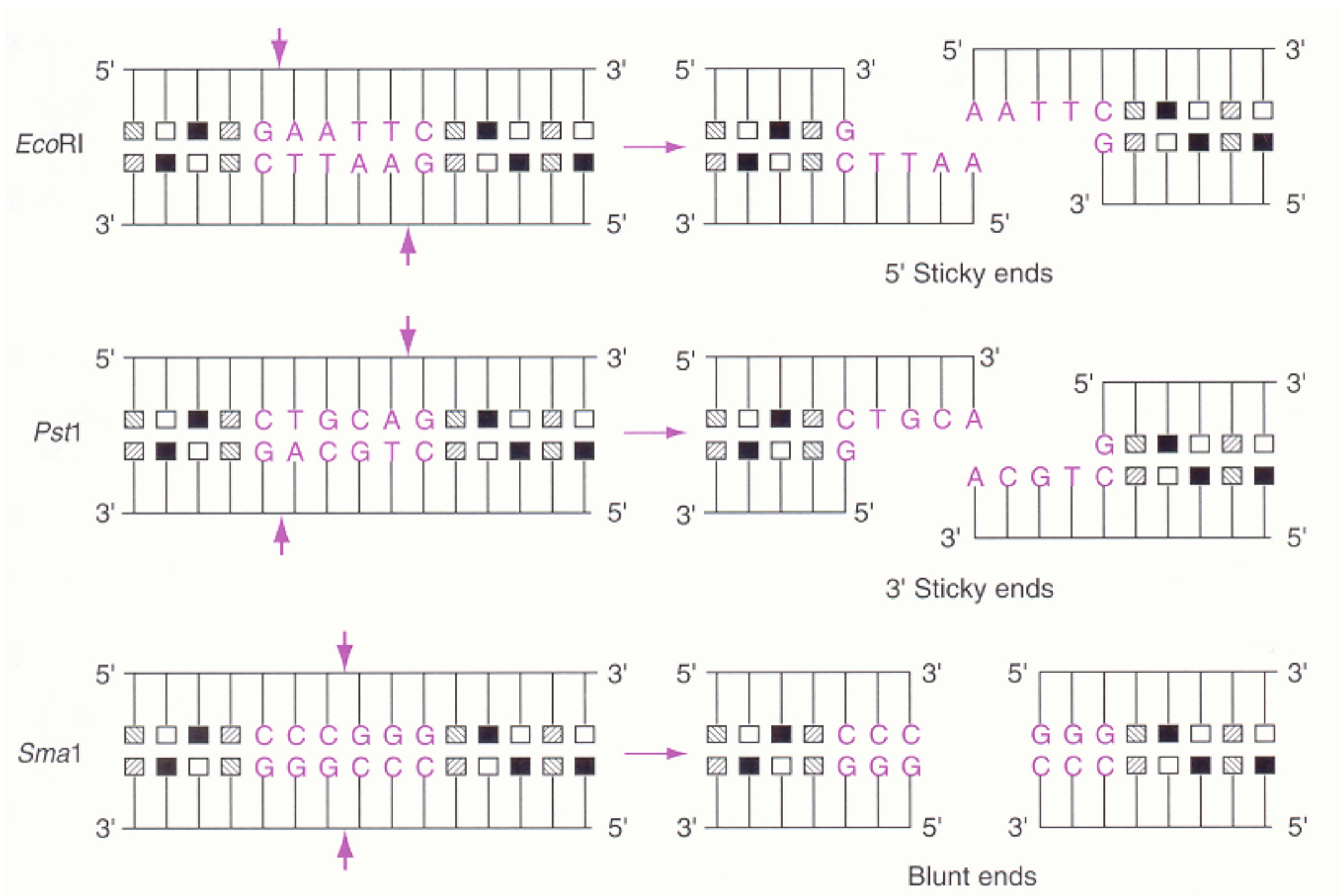
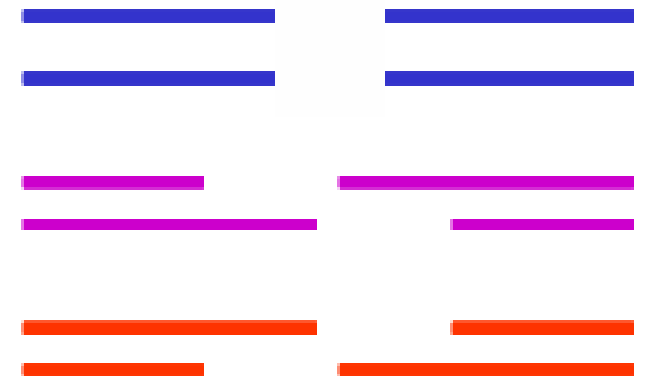
5` GGATTC 3`

5` GGATTT 3`

5` AGATTT 3`

3 typy RE-fragmentů:

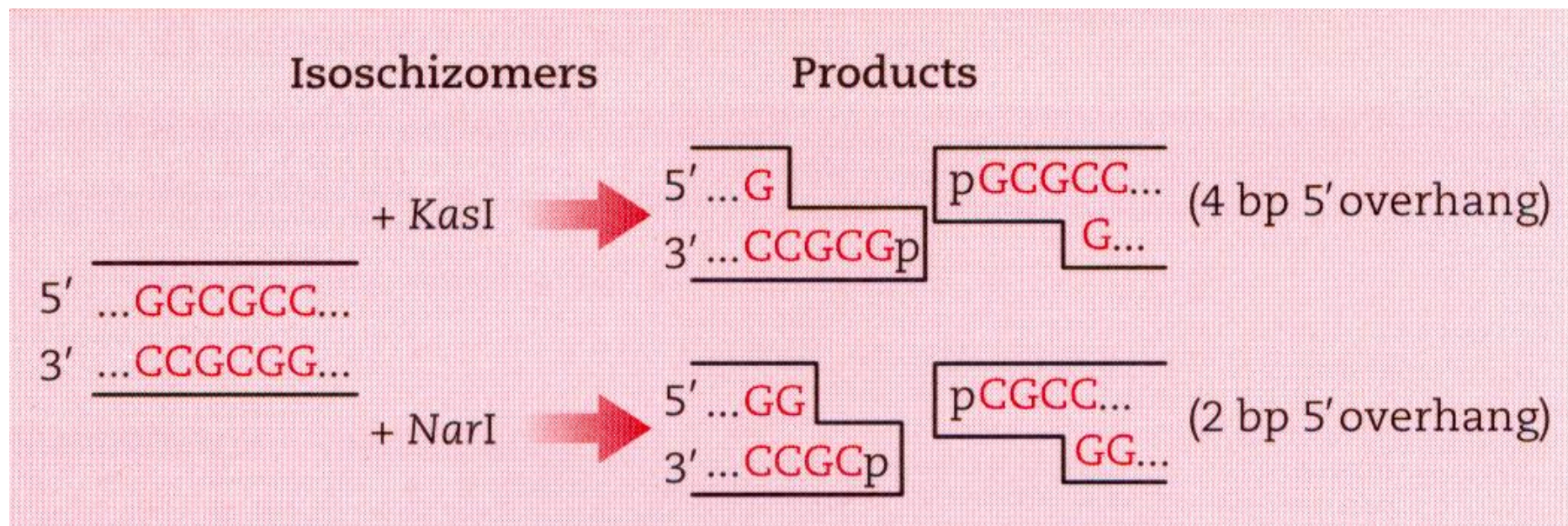
- a) s tupými konci
- b) přesahujícími 5` - konci
- c) přesahujícími 3` - konci



Restrikční štěpení DNA

Jednotka enzymu = množství RE, které rozštěpí 1 μg dsDNA (obvykle DNA fága I) za 1 hod. při optimální teplotě a optimálních podmínkách uvedených pro každou RE

IZOSCHIZOMERY – různé restriktázy se stejným rozpoznávacím místem



Klíčové faktory pro průběh reakce

Teplota

Iontová síla

Složení restričních pufrů

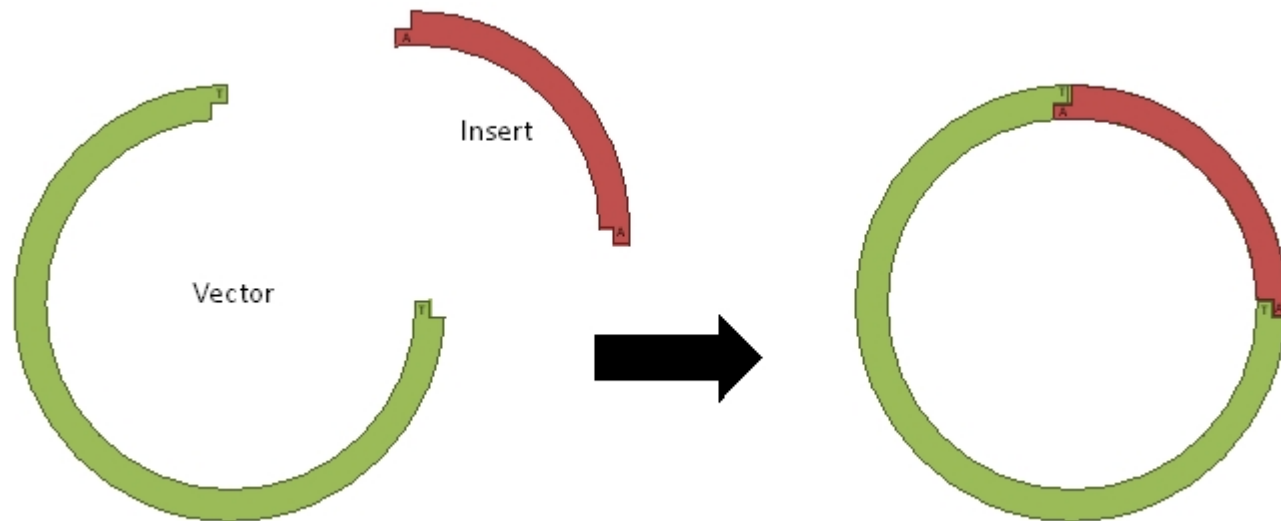
| Pufř | NaCl | Tris.Cl (pH 7,5) | MgCl ₂ |
|----------------------|--------|------------------|-------------------|
| Nízká iontová síla | 0 | 10 mM | 10 mM |
| Střední iontová síla | 50 mM | 10 mM | 10 mM |
| Vysoká iontová síla | 100 mM | 50 mM | 10 mM |

| Složky restričního pufru | Výsledná koncentrace v mM (1:10 řed'. pufru) | | | | |
|--------------------------|----------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | A | B | L | M | H |
| Tris acetate | 33 | - | - | - | - |
| Tris-HCL | - | 10 | 10 | 10 | 50 |
| Mg-acetate | 10 | - | - | - | - |
| MgCl ₂ | - | 5 | 10 | 10 | 10 |
| K-acetate | 66 | - | - | - | - |
| NaCl | - | 100 | - | 50 | 100 |
| Dithioerythritol (DTE) | - | - | 1 | 1 | 1 |
| Dithiothreitol (DTT) | 0,5 | - | - | - | - |
| 2-Mercaptoethanol | - | 1 | - | - | - |
| pH při 37 °C | 7,9 | 8,0 | 7,5 | 7,5 | 7,5 |

Pufřy a enzymy se uchovávají při -20 °C

Pracujeme s nimi na ledu

Štěpení více restriktázami



R1 i **R2** ve stejném pufru

R1

pufr s nízkou iont silou..

R2

pufr s vyšší iont. silou

Využití restrikčního štěpení:

RE- spektra - DNA otisky - stanovení příbuznosti

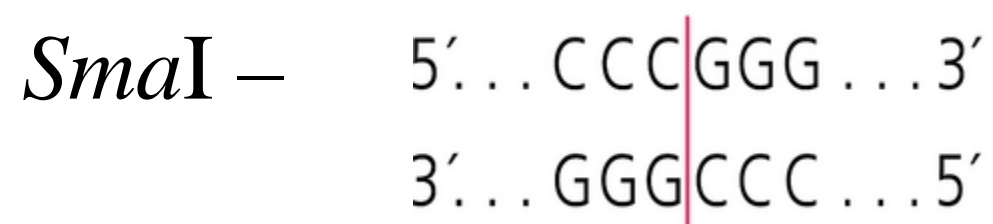
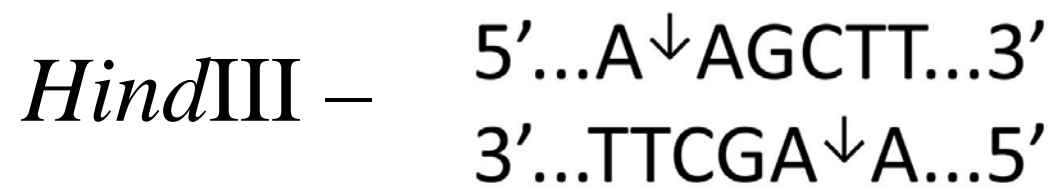
Restrikční mapování

Příprava molekulárních sond - hybridizační sondy

Klonování DNA

Detekce mutací a polymorfismů

Úloha 3



| | | |
|-----------------------|----------|------|
| Reakční směs (20 ul): | voda | ? ul |
| | 10x pufr | 2 ul |
| | DNA | 1ug |
| | enzym | 5U |